

令和元年5月29日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10414

研究課題名(和文) 癌細胞初代培養系(CTOS法)を用いた分化型腺癌の放射線耐性メカニズムの検討

研究課題名(英文) Investigation of radio-resistant mechanism of well differentiated adenocarcinoma using a primary culture system, CTOS

研究代表者

遠藤 洋子(Endo, Hiroko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：20359300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、三次元培養系CTOS(Cancer Tissue-Originated Spheroid)法を用いて、高分化型腺癌である大腸癌の放射線感受性と、分化/幹細胞性の関係を検討したものである。大腸癌CTOSの分化/幹細胞性は培養条件や機械的刺激によって大きく揺らぐこと、およびWntシグナルが高い状態にあるCTOSが放射線照射後の再増殖に寄与することを見出した。また、HDAC阻害剤は大腸癌CTOSの幹細胞性を低下させ、放射線感受性を増大させることを見出し、放射線増感剤として利用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常組織における分化/幹細胞の階層性が放射線感受性に与える影響は、トランスジェニックマウスを用いた研究で多く報告されている。しかし、大腸がんをはじめとする分化型腺癌の幹細胞性と放射線感受性に関しては、あまり研究されてこなかった。その理由のひとつとして、分化型腺癌の特徴を保持した実験系が存在しなかったことが挙げられる。今回、我々は三次元培養系CTOS法を用いて、大腸癌細胞の分化/幹細胞性が大きく揺らぐこと、その中でもWntシグナルが高い状態にある癌細胞が放射線耐性を示すことを見出した。CTOS法は、分化型腺癌を対象とした放射線増感剤の研究プラットフォームとなりうる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of stem/differentiation status on radio-sensitivity of well-differentiated colorectal cancer using three-dimensional culture system, CTOS (Cancer Tissue-Originated Spheroid). We found that the stem/differentiation status of colorectal cancer CTOS was highly fluctuated by the difference in culture conditions or the stimulation of mechanical disruption. CTOSs with high Wnt signaling were resistant to X-ray irradiation. Pre-treatment of CTOS with HDAC inhibitors resulted in the downregulation of stemness genes and enhanced radio-sensitivity. These results indicated that HDAC inhibitors could be a radio-sensitizer for colorectal cancer though attenuating the stemness of well differentiated adenocarcinoma.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線感受性 分化型腺癌 三次元培養系 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常腸管組織は分化/幹細胞の階層性が厳密に保たれた組織であり、2種類の幹細胞が存在するといわれている¹。一つは、LGR5陽性の幹細胞であり、恒常的な細胞増殖と組織再生を担っている。もう一つが静止期幹細胞と呼ばれる幹細胞であり、通常は細胞分裂を行わないが、放射線障害などによる腸管損傷の際には再び幹細胞性を取り戻し、組織再生に寄与する²。つまり、放射線照射後の組織再生は非常に可塑的な腸管上皮幹細胞によって行われている。

本研究では、我々が開発した癌細胞三次元培養系を用いて、高分化型腺癌である大腸がんの分化/幹細胞性の揺らぎが放射線感受性に与える影響を検討した。

2. 研究の目的

大腸癌の多くは中-高分化型腺癌であるが、分化/幹細胞性の可塑性と放射線感受性に関してはあまり研究がなされてこなかった。その理由の一つが、高分化型腺癌の分化/幹細胞性を観察できる実験系が存在しなかったからである。我々が開発したCTOS (Cancer Tissue-Originated Spheroid)法は、由来する患者の組織像を保持したまま癌細胞を三次元培養できる実験系である³。大腸癌CTOSは、腺腔構造や頂底極性といった三次元的特徴を保持している⁴。また、機械的な破碎による刺激が大腸癌CTOSの幹細胞性を上昇させることを報告している⁵。

本研究では、大腸癌CTOSを用いて分化/幹細胞性の揺らぎが放射線感受性に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) CTOSの調製および培養

大阪国際がんセンターにて同意の得られた患者より提供を受けた大腸癌組織を用いた。腫瘍組織を機械的、酵素的に分散し、得られたフラグメントをセルストレイナー (FALCON) によって分離した。100 μ m または 40 μ m のメッシュ上に残ったフラグメントを回収し、StemPro hESC (Invitrogen)を用いて浮遊培養した。得られたスフェロイド (CTOS) を NOD/scid マウスに移植して患者移植腫瘍を作製した。患者移植腫瘍より再びCTOSを調製し、本研究に用いた。

(2) CTOSの機械的粉碎

100 μ m 以上のCTOSを回収し、100 μ Lの培地中で27Gシリンジを用いて10回出し入れし、CTOSを粉碎した。粉碎したCTOSは再びStemPro hESC中で浮遊培養した。粉碎 (disrupted) 群は、実験の1日前に機械的粉碎を行った。非粉碎 (non-disrupted) 群では、機械的粉碎後7日以上浮遊培養を行った。実験には、40 μ m 以上、100 μ m 以下のCTOSを利用した。

(3) CTOSの放射線感受性試験

CTOSをnon-treated 96ウエルプレート (IWAKI) に1ウエル1個ずつ、5 μ Lのマトリゲル Growth Factor Reduced (GFR) (BD) に包埋し、100 μ LのStemPro hESC中で培養した。放射線照射群はn=48、対象群はn=12とした。CTOSを包埋後一晩前培養し、翌日X線照射装置 (AB-160) にてX線を照射した (1Gy/min)。CTOSの面積はCell³ Imager

Duos (Screen ホールディングス)にて計測した。放射線照射後 14 日間培養し、CTOS 面積の増大率を 5 倍以下に抑えた確率を Spheroid control probability (SCP)として計算した⁶。薬剤による前処理を行う場合は、CTOS 包埋と同時に薬剤を添加し、一晚培養後培地ごと薬剤を除去し、PBS で洗浄したのち StemPro hESC 中で 2 時間培養し、その後 X 線を照射した。

4. 研究成果

(1) CTOS の Spheroid control probability

4 人の患者由来の大腸癌 CTOS を用いて、X 線照射後の Spheroid control probability (SCP) を求めた。CTOS の放射線感受性は CTOS ラインごとに異なり、50% Spheroid control dose (50%SCD)は 1.6Gy から 8.8Gy と幅があった。我々は、再増殖した CTOS が、放射線耐性の特殊なクローン由来であるかどうかを検討するために、9Gy 照射後に再増殖した 5 つの CTOS を選んで in vitro で増殖させ、再び放射線感受性試験を行った。その結果、すべてのクローンで放射線感受性の不均一性が再現された。このことは、放射線照射後に再増殖する癌細胞は、遺伝子変異等で放射線耐性を獲得した特殊な癌細胞由来ではなく、ある一定の確率で再増殖するものであることを示唆している。

(2) 機械的粉砕による CTOS の放射線感受性の低下

大腸癌 CTOS の放射線感受性が、分化/幹細胞性の変化に影響を受けるかどうかを検討した。我々は、以前に機械的な粉砕が大腸癌 CTOS の幹細胞性を上昇させること⁵を報告している。機械的粉砕によって、LGR5 などの Wnt 標的遺伝子群は一過性に上昇する。本研究においては、機械的粉砕群(disrupted)と非粉砕群 (non-disrupted)で放射線感受性を比較した。その結果、9Gy 照射後 14 日目の CTOS の再増殖率は、disrupted 群で有意に上昇した。このことは、CTOS の放射線照射後の再増殖が、単純な確率論ではなく、CTOS の内在的な要因で変化することを示唆している。

(3) HDAC 阻害剤による放射線増感作用

CTOS の放射線感受性試験をプラットフォームとして、放射線増感剤の探索を行った。特に、分化/幹細胞性に影響を与える可能性のある薬剤を中心に検討を行った。その結果、トリコスタチン A、Vorinostat (SAHA)などの HDAC 阻害剤による前処理が、9Gy 照射後の CTOS の再増殖を著しく抑制することを見出した。なお、放射線非照射群では、CTOS の増殖に HDAC 阻害剤の前処理は影響を与えなかった。

HDAC 阻害剤が CTOS の遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析するため、マイクロアレイを行った。Gene set enrichment analysis の結果、HDAC 阻害剤の前処理によって G2/M チェックポイントや DNA 修復に関連する遺伝子群の発現が低下していることが明らかとなった。さらに、LGR5 や ASCL2 といった腸管上皮細胞の幹細胞性にかかわる遺伝子群の発現が低下していた。

(4) Wnt 阻害剤による放射線増感作用

Wnt 阻害剤である XAV939 で CTOS を前処理したのちに X 線を照射したところ、機械的粉砕で上昇した 9Gy 照射後の再増殖率は、XAV939 による前処置によって低下した。このことは、X 線照射後に再増殖する細胞は、照射時に Wnt シグナルが高い状態の癌細胞であることを示唆している。

(5) 考察

本研究において、分化型腺癌の形態的特徴を保持した大腸癌 CTOS を用いて放射線感受性試験を行った。大腸癌 CTOS の放射線感受性は患者ごとに異なり、また同一患者由来であっても CTOS 間の放射線感受性に大きな不均一性が認められた。大腸癌 CTOS の分化または幹細胞性に関する遺伝子発現は、培養条件または機械的粉碎等の要因で大きく変動し、機械的粉碎では Wnt シグナルの一過性の上昇が認められた⁵。機械的粉碎によって Wnt シグナルが活性化した CTOS では、非粉碎群と比較して有意に 9Gy 照射後の再増殖率が上昇した。この上昇は Wnt 阻害剤の前処理によって抑制されるため、放射線照射後に再増殖する癌細胞は、照射時の段階で Wnt シグナルが高い細胞であることを示唆された。また、HDAC 阻害剤は X 線照射後の CTOS の再増殖を低下させるが、その作用点の一つとして LGR5 や ASCL2 など、大腸がんの幹細胞性の維持に重要な遺伝子群の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

このように、分化型腺癌の特徴を保持した三次元培養系、CTOS を用いることで、従来の癌細胞株による 2 次元培養では実施できなかった分化/幹細胞性と放射線感受性について検討することが可能となった。CTOS は、放射線感受性試験を始めとして、様々な治療反応性試験のプラットフォームとして応用可能である。

<引用文献>

- Bankaitis et al., *Gastroenterology*. 2018 Nov;155(5):1348-1361.
Tian et al., *Cell Reports* 11, 33–42 April 7, 2015
Kondo et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 12;108(15):6235-40.
Okuyama et al. *Am J Pathol*. 2016 Apr;186(4):899-911.
Piulats et al. *Oncotarget*. 2018 Mar 23;9(22):15968-15983.
Ingargiola et al. *Int J Cancer*. 2014 Aug 15;135(4):968-80.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Dormancy in cancer.

Endo H, Inoue M.

Cancer Sci. 2019 Feb;110(2):474-480. doi: 10.1111/cas.13917. (査読有)

High-throughput screening in colorectal cancer tissue-originated spheroids.

Kondo J, Ekawa T, **Endo H**, Yamazaki K, Tanaka N, Kukita Y, Okuyama H, Okami J, Imamura F, Ohue M, Kato K, Nomura T, Kohara A, Mori S, Dan S, Inoue M.

Cancer Sci. 2019 Jan;110(1):345-355. (査読有)

Promotion of malignant phenotype after disruption of the three-dimensional structure of cultured spheroids from colorectal cancer.

Piulats JM, Kondo J, **Endo H**, Ono H, Hagihara T, Okuyama H, Nishizawa Y, Tomita Y, Ohue M, Okita K, Oyama H, Bono H, Masuko T, Inoue M.

Oncotarget. 2018 Mar 23;9(22):15968-15983. doi: 10.18632/oncotarget.24641. (査読有)

Spheroid Cultures of Primary Urothelial Cancer Cells: Cancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS) Method.

Yoshida T, Okuyama H, **Endo H**, Inoue M.

Methods Mol Biol. 2018;1655:145-153. doi: 10.1007/978-1-4939-7234-0_12. (査読有)

The induction of MIG6 under hypoxic conditions is critical for dormancy in primary cultured lung cancer cells with activating EGFR mutations.

Endo H, Okami J, Okuyama H, Nishizawa Y, Imamura F, Inoue M.

Oncogene. 2017 May 18;36(20):2824-2834. doi: 10.1038/onc.2016.431. (査読有)

The distinct metabolic phenotype of lung squamous cell carcinoma defines selective vulnerability to glycolytic inhibition.

Goodwin J, Neugent ML, Lee SY, Choe JH, Choi H, Jenkins DMR, Ruthenborg RJ, Robinson MW, Jeong JY, Wake M, Abe H, Takeda N, **Endo H**, Inoue M, Xuan Z, Yoo H, Chen M, Ahn JM, Minna JD, Helke KL, Singh PK, Shackelford DB, Kim JW.

Nat Commun. 2017 May 26;8:15503. doi: 10.1038/ncomms15503. (査読有)

In vivo and ex vivo cetuximab sensitivity assay using three-dimensional primary culture system to stratify KRAS mutant colorectal cancer.

Tashiro T, Okuyama H, **Endo H**, Kawada K, Ashida Y, Ohue M, Sakai Y, Inoue M.

PLoS One. 2017 Mar 16;12(3):e0174151. doi: 10.1371/journal.pone.0174151. eCollection 2017. (査読有)

CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression.

Kimura H, Fumoto K, Shojima K, Nojima S, Osugi Y, Tomihara H, Eguchi H, Shintani Y, **Endo H**, Inoue M, Doki Y, Okumura M, Morii E, Kikuchi A.

J Clin Invest. 2016 Jul 1;126(7):2689-705. doi: 10.1172/JCI84658. (査読有)

Generation of a monoclonal antibody recognizing the CEACAM glycan structure and inhibiting adhesion using cancer tissue-originated spheroid as an antigen.

Sato Y, Tateno H, Adachi J, Okuyama H, **Endo H**, Tomonaga T, Inoue M.

Sci Rep. 2016 Apr 21;6:24823. doi: 10.1038/srep24823. (査読有)

Dynamic Change of Polarity in Primary Cultured Spheroids of Human Colorectal Adenocarcinoma and Its Role in Metastasis.

Okuyama H, Kondo J, Sato Y, **Endo H**, Nakajima A, Piulats JM, Tomita Y, Fujiwara T, Itoh Y, Mizoguchi A, Ohue M, Inoue M.

Am J Pathol. 2016 Apr;186(4):899-911. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.12.011. (査読有)

Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer.

Kiyohara Y, Yoshino K, Kubota S, Okuyama H, **Endo H**, Ueda Y, Kimura T, Kimura T, Kamiura S, Inoue M.

Cancer Sci. 2016 Apr;107(4):452-60. doi: 10.1111/cas.12898. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

第 41 回日本分子生物学会年会 (招待講演) (2018 年)

Induction of dormancy as a survival strategy of cancer cells

Hiroko Endo and Masahiro Inoue

第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年)

HDAC inhibitors sensitize well-differentiated colorectal cancer spheroid to X-ray irradiation

Hiroko Endo, Jumpei Kondo, and Masahiro Inoue

第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年)

Radiation sensitivity assay for well-differentiated adenocarcinoma using colorectal cancer spheroid

Hiroko Endo, Jumpei Kondo, and Masahiro Inoue

第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年)

A shuttle system between patient-derived xenograft and ex vivo culture for efficient drug screening

Hiroko Endo, Hiroaki Okuyama, Satoshi Kubota, Yoji Kukita, and Masahiro Inoue

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：井上 正宏

ローマ字氏名：Inoue Masahiro

所属研究機関名：地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪国際がんセンター（研究所）

部局名：その他部局等

職名：特別研究員

研究者番号（8 桁）：10342990

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。